

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
21 juin 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/43771 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
A61K 39/21, C07K 16/10, A61K 9/00, 39/00, 39/12

(74) Mandataire: RINUY, SANTARELLI; 14, avenue de la  
Grande Armée, Boîte postale 237, F-75822 Paris Cedex 17  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/03526

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international:  
14 décembre 2000 (14.12.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/15825 15 décembre 1999 (15.12.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): NEO-  
VACS [FR/FR]; 59, avenue Victor Hugo, F-75116 Paris  
(FR).

Publiée:  
— Avec rapport de recherche internationale.

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*): ZAGURY,  
Daniel [FR/FR]; 1, rue Frédéric Leplay, F-75007 Paris  
(FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF INACTIVATED IMMUNOSUPPRESSIVE OR ANGIOGENIC IMMUNOGENIC PROTEINS FOR PRODUC-  
ING SECRETORY IGA'S

(54) Titre: UTILISATION DE PROTEINES IMMUNOGENES IMMUNOSUPPRESSIVES OU ANGIOGENIQUES RENDUES  
INACTIVES POUR LA PRODUCTION D'IGA SECRETOIRES

(57) Abstract: The invention concerns the use of a protein derived from cancer cells, cells infected by a virus or immune cells or an inactive fragment of said protein, said protein being initially an immunosuppressive and/or an angiogenic protein with local activity whereof said properties have been inactivated by at least 70 % by a physical and/or chemical treatment, such as formolisation, carboxamidation, carboxymethylation, maleimidation or oxidation by oxygen bubbling, by genetic recombination or by adjuvant conditioning, said treatment preserving its property of being identified by antibodies directed against said protein, and preserving sufficient immunogenic properties for generating antibodies neutralising or blocking said native protein, or the use of a DNA molecule corresponding to said protein inactivated by mutation or to said inactive fragment, for obtaining a medicine designed to provide a patient with mucosal immunity based on secretion of IgA secretory antibodies, pharmaceutical compositions for the mucous membranes and IgA antibodies.

(57) Abrégé: Utilisation d'une protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires ou encore d'un fragment inactif de cette protéine, ladite protéine étant une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale dont ces propriétés sont rendues inactives d'au moins 70 %, par un traitement physique et/ou chimique, tel qu'une formolisation, une carboxamidation, une carboxyméthylation, une maléimidation ou une oxydation par barbotage d'oxygène, par recombinaison génétique ou encore par un conditionnement adjuvant, ledit traitement lui conservant la propriété d'être reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine, et lui conservant des propriétés immunogènes suffisantes pour générer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, ou encore l'utilisation d'une molécule d'AND correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif, pour l'obtention d'un médicament destiné à conférer à un patient une immunité muqueuse fondée sur la sécrétion d'anticorps de classe IgA sécrétoire, compositions pharmaceutiques pour la voie muqueuse et anticorps de classe IgA.



WO 01/43771 A1

## UTILISATION DE PROTEINES IMMUNOGENES IMMUNOSUPPRESSIVES OU ANGIOGENIQUES RENDUES INACTIVES POUR LA PRODUCTION D'IGA SECRETOIRES

5                   La présente invention concerne l'utilisation d'une protéine  
provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de  
cellules immunitaires, d'un fragment d'une telle protéine ou encore d'une  
molécule d'ADN correspondant à ladite protéine ou fragment, pour la  
préparation d'un médicament destiné à conférer à un patient une immunité  
10   mucosale fondée sur la sécrétion d'IgA sécrétoires.

                  On recherche toujours des composés actifs pour lutter contre le  
cancer qui est le fléau médical majeur de notre époque. De nombreuses  
thérapies ont été développées avec un succès variable puisqu'il y a encore une  
mortalité importante. Ces thérapies ont d'abord été l'exérèse chirurgicale pour  
15   les tumeurs solides, la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces thérapies  
semblent insuffisantes dans de nombreux cancers pour lesquels aucun succès  
clinique n'a été enregistré indiquant une prolongation importante de la survie  
des patients ou leur guérison totale.

                  Les cancers sont des proliférations de cellules qui peuvent  
20   ensuite essaimer dans l'organisme pour former des métastases. Il est connu  
que le système immunitaire d'un individu normal élimine régulièrement les  
cellules cancéreuses naissantes (concept d'immunosurveillance), et que la  
formation d'un cancer est associée 1) à l'échappement du système de  
surveillance immunitaire local puis à une période avancée du cancer, à une  
25   immunosuppression systémique et 2) à une prolifération des cellules  
endothéliales vasculaires assurant l'apport nutritif des cellules tumorales  
(néoangiogénèse).

                  La plupart des agents anticancéreux (chimiothérapie,  
radiothérapie) utilisés à ce jour luttent contre la réplication des cellules  
30   cancéreuses. Ces agents ne visent pas l'environnement particulier nécessaire  
à la prolifération des cellules cancéreuses, caractérisé à la fois par l'absence

d'activité locale (paracrine) des cellules immunitaires antitumorales (échappement immunitaire) et par l'apparition d'une vascularisation intratumorale (néoangiogénèse).

C'est pourquoi, récemment, de nouvelles approches  
5 thérapeutiques ont été introduites. Certaines visent à stimuler le système immunitaire antitumeur par thérapie cellulaire ou par l'activation de gènes codant pour des protéines stimulant la réponse immunitaire (thérapie génique) ou encore en immunisant directement contre des antigènes, identifiés comme spécifiques ou associés, de la tumeur du type des MAGE (vaccination).  
10 D'autres visent à lutter contre la néoangiogénèse, en utilisant des antimétabolites détruisant les cellules endothéliales (Judah Folkman). Dans ce nouveau contexte il est à noter que De Bruijn et al., (Cancer Res. (1998) 58, pages 724-731) ont décrit l'utilisation de protéines E6 et E7 natives pour induire une réponse cellulaire cytotoxique (CTL) chez des souris pour les protéger contre  
15 l'implantation de cellules tumorales.

Or la demanderesse a découvert avec étonnement, après de longues recherches, que des facteurs immunosuppresseurs ou angiogéniques à action paracrine sont induits par les tumeurs. Ces facteurs qui sont solubles peuvent, d'une part, empêcher localement les cellules du système immunitaire  
20 d'agir efficacement, même si on les stimule (immunosuppression) et peuvent, d'autre part, assurer la nutrition des cellules cancéreuses, en activant la prolifération des cellules endothéliales (angiogénèse).

Le phénomène d'échappement aux défenses immunitaires cellulaires de l'hôte par induction de leur paralysie in situ est une stratégie  
25 utilisée par de nombreux cancers et est nécessaire à leur survie. Initialement l'immunosuppression reste localisée au niveau de la tumeur, puisque l'individu est encore capable de se défendre contre les autres agressions telles que des infections. Cependant à un stade plus tardif, cette immunosuppression peut s'étendre, se généraliser, ainsi que l'attestent la dissémination de métastases  
30 et la grande vulnérabilité du cancéreux face aux infections ceci en dehors même des effets débilissants dus à la chimiothérapie ou radiothérapie. En

résumé, cet échappement au contrôle du système immunitaire est dû à une paralysie du système immunitaire (immunosuppression), qui l'empêche de fonctionner normalement. Cette immunosuppression met en jeu des facteurs paralysants, qui sont produits par les cellules cancéreuses ou leur  
5 environnement. La paralysie locale des cellules du système immunitaire ou immunosuppression représente donc une arme majeure des cellules cancéreuses qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ainsi, des protéines relâchées par les cellules infectées agissent comme de véritables toxines sur les cellules immunitaires alentour, les dérèglent et  
10 bloquent in situ (de manière paracrine) les cellules du système immunitaire, protégeant les cellules infectées.

Les tumeurs malignes sont caractérisées par la présence d'une vascularisation importante, qui assure un afflux de sang nécessaire à la nutrition des cellules cancéreuses. Cette vascularisation est réalisée par  
15 l'activation des cellules endothéliales vasculaires induites au contact des cellules tumorales (néoangiogénèse). Les travaux de Judah Folkman ont récemment mis en évidence que le contrôle de la néoangiogénèse tumorale pouvait représenter une arme efficace décisive contre les cancers (Folkman J., *Semin. Cancer Biol.*, 1992, 3 (2) : 65-71).

20 Dans ce contexte physiopathologique, la demanderesse a découvert, après de longues recherches, dans le cas de l'ATL, du cancer du col utérin, et du sarcome de Kaposi, trois protéines impliquées dans une immunosuppression locale au niveau de la tumeur : il s'agit de la protéine Tax de HTLV 1, de la protéine E7 du papilloma virus, et de la protéine Tat du VIH-1  
25 dans le sarcome de Kaposi. Dans ce dernier cas, il existerait aussi comme agent étiologique un virus de l'herpès (le HHV8), qui expliquerait que le sarcome de Kaposi survient aussi chez des sujets non infectés par le VIH-1. Tat a été impliquée dans le sarcome de Kaposi, mais sans que les chercheurs n'identifient son rôle générateur d'immunosuppression locale qui favorise la  
30 génération de sarcomes de Kaposi. De manière intéressante, la demanderesse a trouvé que certaines de ces protéines immunosuppressives, telles la protéine



Tat du HIV-1 et la protéine E7 de HPV (souches 16 et 18) ont également des effets activateurs sur les cellules endothéliales vasculaires.

Pour lutter contre ces facteurs immunosuppresseurs et/ou angiogéniques, la demanderesse a proposé d'induire par voie générale des anticorps spécifiques dirigés contre ces facteurs extra-cellulaires. C'est ainsi qu'elle a décrit l'administration des protéines précitées par les deux voies conventionnelles d'administration des vaccins, à savoir la voie orale et la voie injectable.

Ainsi, dans une précédente demande de brevet, la demanderesse a montré comment bloquer par des anticorps spécifiques les facteurs solubles relâchés par les cellules tumorales ou infectées par un virus. Par "facteurs solubles", l'on entend des facteurs (en général des protéines) synthétisés par ces cellules et relâchés dans le milieu extracellulaire soit par transport actif soit par diffusion passive. Les facteurs extracellulaires précités peuvent agir in situ soit en inhibant la réponse cellulaire immunitaire, incluant l'activation des lymphocytes T cytolytiques (CTL), soit en perturbant le réseau cytokinique, soit en satisfaisant par la néoangiogénèse les besoins nutritifs de la tumeur. Ces facteurs extracellulaires peuvent être d'origine cellulaire (cytokines) ou, pour les cancers induits par des virus ou les maladies virales, des protéines virales, principalement des protéines de régulation, présentes dans le milieu extracellulaire.

Elle a décrit notamment des moyens permettant d'obtenir, dans le milieu circulant, des anticorps de classe IgG dirigés spécifiquement contre des facteurs délétères, par exemple immunosuppresseurs et/ou angiogéniques, lesdits anticorps étant susceptibles de bloquer ces facteurs et d'en neutraliser les effets sur les cellules immunitaires et/ou endothéliales. Ces anticorps spécifiques de classe IgG ont été soit induits par immunisation active (vaccination) dirigée contre les protéines notamment les facteurs solubles préalablement identifiés, soit administrés passivement (immunisation passive). Les anticorps circulants, présents dans le milieu extracellulaire, en se combinant à ces protéines, peuvent en neutraliser les effets indésirables.

La demanderesse a identifié dans au moins trois cancers viro-induits de tels facteurs solubles : le sarcome de Kaposi (HIV-1), le cancer du col de l'utérus (HPV) et la leucémie ATL (HTLV-1 et -2). Ces 3 facteurs, tous d'origine virale, sont respectivement la protéine Tat du HIV-1, la protéine E7 du HPV et la protéine Tax du HTLV -1.

De nombreux cancers sont induits par des virus comme le HIV-1 responsable du sarcome de Kaposi et d'autres cancers, le HPV à l'origine du cancer du col de l'utérus, l'HBV et l'EBV associés, respectivement, à l'Hépatome et à la maladie de Burkitt.

La maladie SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) due au HIV-1 et caractérisée par une immunosuppression cellulaire généralisée, peut se manifester par le sarcome de Kaposi, cancer vasculaire, ou par d'autres formes de cancer dont certaines leucémies ou lymphomes. L'immunosuppression cellulaire observée dans cette maladie qui favorise l'apparition de ces cancers est induite par la protéine Tat de régulation du HIV-1, qui, si elle n'appartient pas à la structure propre du virus, est relâchée par les cellules infectées dans le milieu extracellulaire. Sous cette forme extracellulaire, la protéine Tat, agissant en véritable toxine virale, exerce un effet immunosuppresseur sur les cellules immunitaires avoisinantes (Zagury D. et al.; *PNAS*, 1998, 95 : 3851-56). De plus, au niveau du sarcome de Kaposi, il a été montré que la protéine Tat associée aux cytokines inflammatoires ( $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) et au BFGF, favorisait la néoangiogénèse qui forme la tumeur (Ensoli B. *J. Virol.* 1993, 67 : 277-287).

En fait, de par ses propriétés immunosuppressives et angiogéniques, la protéine Tat, présente dans le milieu extracellulaire, favorise dans la maladie Sida, non seulement le développement du sarcome de Kaposi, causé par le virus HHV8, mais également d'autres cancers, incluant des lymphomes ou des leucémies.

Le cancer épithélial du col de l'utérus est provoqué par certaines souches du virus HPV (souches 16 et 18). Les cellules cancéreuses de ce cancer n'expriment que 2 protéines d'apparition précoce de ce virus, la protéine

E6 et la protéine E7 qui, toutes deux, ont des effets sur les facteurs régulateurs du cycle cellulaire de la cellule cancéreuse. Par ailleurs, la protéine E7, présente dans le milieu extracellulaire, explique l'apparition chez les malades de faibles taux d'anticorps anti-E7. La protéine E7 extracellulaire, tout comme  
5 la protéine Tat extracellulaire peut agir localement comme une toxine sur les cellules stromales (cellules lymphoïdes ou cellules endothéliales) de la tumeur.

Cette protéine E7 a en effet montré expérimentalement des propriétés immunosuppressives et angiogéniques. L'immunosuppression induite par la protéine E7 a été caractérisée par l'inhibition de la prolifération  
10 des cellules T stimulées par le PPD ou le toxoïde tétanique, l'inhibition de la prolifération des cellules T stimulées par des cellules allogéniques, la surproduction d'IFN $\alpha$  (cytokine immunosuppressive) par les cellules présentant l'antigène (APC). Le pouvoir angiogénique de la toxine E7 sur les cultures de cellules endothéliales provenant du cordon ombilical de nouveau-nés et  
15 prétraitées par la protéine E7 a été suggéré par les observations suivantes : formation de nids cellulaires nombreux, visibles au contraste de phase ; identification par Facs de marqueurs CAM (ICAM et VCAM) au sein des cellules endothéliales et modification du cytosquelette des cellules en culture observées par immunofluorescence et altération de l'expression du monoxyde  
20 d'azote synthétase inductible par les cellules endothéliales en culture, en présence de la protéine E7. Comme on le verra dans les exemples de manière plus décisive, le pouvoir angiogénique de la toxine E7 peut être directement démontré " in vitro " par l'activation des cellules endothéliales vasculaires provenant de lignées cellulaires ou de cellules fraîches de cordon ombilical de  
25 nouveau-nés induites par la protéine E7 du HPV (souche 16).

En poursuivant ces recherches, la demanderesse s'est rendue compte que lorsqu'il s'agit d'un cancer touchant une muqueuse épithéliale tel que le cancer du col de l'utérus ou encore une infection virale touchant les muqueuses génitales, vaginales, intestinales ou rectales, il était important que  
30 la réaction immunitaire destinée à lutter contre la maladie puisse agir localement, au sein de ces muqueuses pour la bloquer à un stade précoce.

Il paraissait donc souhaitable d'induire une réaction immunitaire mucoale, générant des anticorps de classe IgA sécrétoires.

L'induction d'anticorps dirigés contre les facteurs viraux extracellulaires telles les protéines Tat, E7 ou Tax, comme des toxines sur les  
5 cellules stromales lymphoïdes ou endothéliales intratumorales, implique la préparation d'immunogènes biologiquement dépourvus des effets délétères de la protéine native. De tels immunogènes ou les anticorps spécifiques qu'ils induisent peuvent grâce à leurs propriétés combattre l'immunosuppression et/ou l'angiogénèse présente (s) au sein des tumeurs et donc être utiles en tant  
10 que médicaments anticancéreux. Mais l'utilisation de molécules d'ADN permet aussi d'atteindre cet objectif.

La présente demande a principalement pour objet l'utilisation :

- d'un produit obtenu à partir d'une protéine naturelle qui sera modifiée par toute technique connue comme par voie chimique, physique (dont forme  
15 galénique) ou par ingénierie génétique, de telle sorte que ses propriétés immunosuppressives sont inactivées d'au moins 70%, de préférence d'au moins 90%, notamment d'au moins 95%, par un traitement chimique, physique et/ou par construction génétique appropriée, voire par une présentation appropriée, ou
- 20 - d'une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif, représentant la version toxoïde des vaccins génétiques (vaccins à ADN).

pour l'obtention d'un médicament destiné à conférer à un patient une immunité mucoale, fondée sur la sécrétion d'anticorps de classe IgA sécrétoire.

25 Elle a aussi pour objet l'utilisation d'un anticorps de classe IgA sécrétoire contre une protéine immunopathogène, en particulier immunosuppressive ou angiogénique à action locale induite par une cellule cancéreuse ou une cellule infectée par un virus, pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation en tant qu'agent anti-immunosuppression  
30 locale et/ou en tant qu'agent anti-angiogénique à action locale.



Etant donné que des cancers peuvent proliférer grâce à l'immunosuppression locale évoquée ci-dessus et à l'angiogénèse, les produits ci-dessus trouvent en partie leur emploi pour l'obtention d'un médicament destiné à son utilisation en tant qu'anticancéreux.

5 La protéine naturelle précitée est caractérisée en ce qu'elle est une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale induite par des cellules cancéreuses ou par des cellules infectées par un virus ou un fragment de ces protéines.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'une  
10 protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires ou encore d'un fragment inactif de cette protéine, ladite protéine étant une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale dont ces propriétés sont rendues inactives d'au moins 70 %, de préférence d'au moins 90%, notamment d'au moins 95%, par  
15 un traitement physique et/ou chimique, tel qu'une formolation, une carboxamidation, une carboxyméthylation, une maléimidation ou une oxydation par barbotage d'oxygène, par recombinaison génétique ou encore par un conditionnement adjuvant, ledit traitement lui conservant la propriété d'être reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine, et lui conservant des  
20 propriétés immunogènes suffisantes pour générer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, ou encore l'utilisation d'une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif, pour l'obtention d'un médicament destiné à conférer à un patient une immunité mucosale fondée sur la sécrétion d'anticorps de classe IgA.

25 Par " agent anti-immunosuppression ou anti-angiogénique " l'on entend que l'agent peut avoir l'un, l'autre ou les deux effets.

Par « protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale » l'on entend que la protéine native, c'est-à-dire avant inactivation, produit l'un, l'autre ou les deux effets.

30 Les protéines rendues inactives ou fragments inactifs de la présente invention, parfois appelés ci-après "protéines inactivées" ou

“toxoides”, ou molécules d’ADN générant la protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale inactivée par mutation et de ce fait présentant le toxoïde par la vaccination ADN (version toxoïde des vaccins génétiques à base d’ADN) permettent de lutter contre les cancers par  
5 une approche complémentaire de celles de l’art antérieur et spécifique, visant la paralysie du système immunitaire et/ou encore l’angiogénèse induite(s) par les substances extracellulaires produites localement dans l’environnement des cellules cancéreuses. Cette paralysie immunitaire et/ou l’angiogénèse constituent une véritable barrière protectrice et/ou une source nutritive pour la  
10 tumeur.

Les protéines rendues inactives, fragments ou molécules d’ADN selon la présente invention permettent de lutter en premier lieu contre ces facteurs protéiques immunosuppresseurs et/ou angiogéniques, par formation mucosale d’anticorps de classe IgA contre ces protéines et notamment contre  
15 ces facteurs protéiques solubles pour permettre au système immunitaire d’agir efficacement et/ou pour bloquer la néoangiogénèse donc au lieu même d’entrée de l’infection ou du siège de la maladie.

Il est important d’utiliser le facteur protéique extracellulaire délétère sous une forme notamment physiquement, chimiquement et/ou  
20 génétiquement modifiée (inactivée) et non native (ou naturelle) afin qu’il n’exerce plus ses effets nocifs (paralysie paracrine du système immunitaire ou angiogénèse locale).

Les traitements physiques peuvent être réalisés par la chaleur, les radiations U.V., les rayons X ou le contact avec une atmosphère riche en O<sub>2</sub>.  
25 Ces traitements physiques générant des modifications intramoléculaires entre radicaux chimiques (groupement thiols par exemple), peuvent de manière appropriée changer la conformation de la molécule, l’inactiver fonctionnellement tout en conservant ses propriétés immunogènes.

Le traitement chimique peut être effectué à l’aide d’un agent de  
30 couplage tel qu’un dialdéhyde, ou d’une protéine porteuse activée par un pré-traitement à l’aide d’un dialdéhyde, de préférence ou le glutaraldéhyde. Le

traitement chimique peut se faire par utilisation d'un monoaldéhyde, notamment de formaldéhyde. On peut à cet égard se reporter à l'enseignement de WO-A-96/27389.

Le traitement chimique peut se faire notamment par d'autres  
5 procédés telle la carboxyméthylation ou la carboxamidation. Un exemple de technique de carboxyméthylation est illustré dans WO-A-99/33872. Le traitement chimique peut se faire également par N éthylmaléidation associée ou non à une glutaraldéhydation.

On peut encore citer comme technique d'inactivation la réaction  
10 d'au moins une fonction thiol de la protéine avec le 4-chloro-7-sulfobenzofurazane d'ammonium, le N-[iodoéthyl]-trifluoroacétamide ou le N-(6-[7-amino-4-méthylcoumarin-3-acétamido]hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio) propionamide ainsi que la réaction d'au moins fonction amino de la protéine avec l'éthylacétimide, un anhydride, le 2-iminothiolane chlorhydrate, le N-  
15 succinimidyl S-acétylthioacétate, le sulfosuccinimidyl acétate, le sulfosuccinimidyl-4-O-[4,4'-diméthoxytrityl]butyrate, le succinimidyl 7-amino-4-méthylcoumarin-3-acétate, le sulfosuccinimidyl 7-amino-4-méthylcoumarin-3-acétate ou le phénylglyoxal.

L'immunogène peut être inactivé grâce à une présentation  
20 galénique au sein d'un liquide huileux, tel l'adjuvant incomplet de Freund ou encore susceptible de modifier les liaisons non covalentes (forces électrostatiques, forces de Van der Waals ou liaisons hydrogène) nécessaires à ses effets toxiques.

Les modifications génétiques peuvent être obtenues par  
25 ingénierie génétique opérant des insertions, des délétions ou des substitutions de résidus, opérations destinées à diminuer ou supprimer les sites fonctionnels délétères de la molécule naturelle. Les mutants génétiques pourront ou non subir un traitement chimique et/ou physique complémentaire. Les protéines modifiées ci-dessus peuvent par exemple être préparées à partir d'une protéine  
30 ayant une séquence identique ou similaire à une séquence peptidique d'une protéine immunopathogène, en particulier immunosuppressive ou

angiogénique, telle que la protéine Tat du VIH-1, la protéine E7 du papilloma virus ou la protéine Tax de HTLV1 ou d'un fragment de ces protéines et être obtenues par exemple par synthèse peptidique conventionnelle sur résine ou par génie génétique. Tous ces procédés sont bien connus de l'état de la technique. Les mutants inactifs mais immunogènes ont au moins une molécule d'ADN qui code pour leur production. De telles molécules d'ADN présentent un intérêt particulier dans la présente invention comme on le verra ci-après.

Afin de vérifier que la protéine native immunosuppressive et/ou angiogénique est bien reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine immunosuppressive modifiée ou son fragment modifié ou non selon l'invention, on peut par exemple vérifier immunologiquement par Elisa en présence d'anticorps spécifiques, la formation de complexes antigène-anticorps.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre, le composé immunogène provient d'un composé natif (protéine ou fragment polypeptidique) traité par un aldéhyde, ou carboxamidé, ou carboxyméthylé, ou maléimidé.

Afin de déterminer si les propriétés immunogènes de la protéine modifiée immunosuppressive et/ou angiogénique ou d'un fragment de cette protéine ont été suffisamment conservées (c'est à dire si il ou elle a été inactivé(e) mais pas dénaturé) pour créer des anticorps bloquant les effets de ladite protéine native, on peut par exemple immuniser des mammifères (lapins, rats, souris) à l'aide d'un composé immunogène selon l'invention et vérifier que les anticorps produits neutralisent les activités immunosuppressives ou angiogénique de la protéine, comme on le verra pour la protéine Tat du VIH-1, la protéine E7 du papilloma virus et la protéine Tax de HTLV1 dans la partie expérimentale.

Afin de déterminer si la protéine immunosuppressive modifiée ou le fragment a perdu au moins la proportion désirée de ses propriétés immunosuppressives, on peut par exemple étudier l'effet de la protéine immunosuppressive sur l'immunosuppression des cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC).

L'ADN (plasmide avec promoteur) peut être délivré aux surfaces

mucosales sous forme d'ADN nu ou formulé, par exemple sous forme de liposomes cationiques ou concentré autour de particules d'or ou encore sous forme de microsphères. Il est avantageusement mis en œuvre en présence d'adjuvants notamment des toxines bactériennes telles que CT (cholera toxine) ou de LT (entérotoxine labile d'E. coli). De telles techniques d'immunisation mucosale avec des vaccins à base de molécules d'ADN sont décrites notamment dans *Microbes and Infection*, 1999, 685-698 par McCluskie et al.

La protéine immunosuppressive ou angiogénique modifiée et immunogène peut dériver d'une quelconque des protéines notamment immunosuppressives à action locale induites par les tumeurs ou chez le malade du Sida ; on retient particulièrement la protéine Tat du virus VIH-1, la protéine E7 du papilloma virus ou la protéine Tax du virus HTLV1. On retient aussi la lectine mannane-dépendante produite par des cellules immunitaires activées.

Par "dérivent" ou "dériver" d'une protéine immunopathogène, en particulier immunosuppressive ou angiogénique à action locale produite par des cellules cancéreuses ou infectées par un virus ou produite par des cellules immunitaires, l'on entend que le composé immunogène peut être constitué de la totalité ou d'un fragment de la protéine immunopathogène, en particulier immunosuppressive ou angiogénique de départ.

Il peut comporter une ou plusieurs modifications dans les acides aminés de cette protéine ou fragment telles que des délétions, substitutions, additions, ou fonctionnalisations telles qu'acylation d'acides aminés, dans la mesure où ces modifications restent dans le cadre précisé ci-dessus (absence de toxicité, caractères immunologiques). Par exemple, en général le remplacement d'un résidu leucine par un résidu isoleucine ne modifie pas de telles propriétés; les modifications doivent généralement concerner moins de 40% d'acides aminés, de préférence moins de 20% et tout particulièrement moins de 10% de la protéine immunopathogène, en particulier immunosuppressive ou angiogénique. Il est important que la protéine ou fragment modifié ne soit pas dénaturé comme on peut le faire par exemple par



un traitement physique comme la chaleur afin de préserver ses sites conformationnels pour que les anticorps induits par les dérivés modifiés soient actifs vis à vis de la protéine native.

Dans des conditions préférentielles, les composés immunogènes de l'invention comportent au moins 50% de la totalité ou d'un segment de la protéine immunopathogène, en particulier immunosuppressive ou angiogénique, de préférence au moins 70%, particulièrement au moins 90%, et tout particulièrement la totalité ou quasi-totalité de ladite protéine immunosuppressive ou angiogénique.

De manière générale, en ce qui concerne les modifications, l'homologie ou la similitude entre l'immunogène modifié et la protéine ou partie de protéine immunosuppressive native, ainsi que les dimensions du composé immunogène, de même que les modalités d'utilisation, ou de couplage du composé immunogène selon l'invention à une protéine immunogène telle que le toxoïde tétanique, on peut en particulier se référer à WO-A-86/06 414 ou à EP-A-0.220.273 ou encore à PCT/US.86/00831, équivalents, dont l'enseignement est incorporé ici par référence.

On préfère aussi un composé immunogène tel que défini ci-dessus qui est un produit obtenu par recombinaison génétique présentant une homologie peptidique de 70% au moins avec les protéines Tat du HIV-1, Tax du HTLV1 ou 2 et E7 de l'HPV ou la lectine mannane-dépendante produite par des cellules immunitaires activées ou avec un segment de ces protéines.

On préfère également un composé immunogène tel que défini ci-dessus caractérisé en ce qu'il est traité par un aldéhyde, qu'il est carboxamidé, carboxyméthylé ou maléimidé.

On préfère enfin un composé immunogène tel que défini ci-dessus caractérisé par un conditionnement adjuvant qui le rend biologiquement inactif, telle qu'une émulsion huileuse en adjuvant de Freund incomplet (IFA).

On peut aussi faire dériver d'un mutant homologue le composé immunogène désiré.

Rappelons ici que par un conditionnement galénique d'une protéine active physiologiquement, on peut masquer son activité biologique tout en conservant son immunogénicité.

La réaction de carboxyméthylation permet de modifier les  
5 groupements thiols (groupements sulfhydryl) présents au niveau des résidus cystéines de l'enchaînement en acides aminés. La carboxyméthylation inactive certaines fonctions toxiques dépendantes des groupements SH comme l'a rapporté pour la protéine Tat Frankel et al. Cell Vol 55 (1988).

Mise à part la carboxyméthylation, la carboxamidation ou la  
10 maléimidation peuvent être utilisées pour bloquer les groupements SH et former des complexes S-carboxyméthylés, S-carboxamidés ou S-maléimidés.

Par exemple, la protéine Tat possède 7 cystéines. Ces cystéines participent à la formation de ponts disulfure inter et intra-chaînes et contribuent à la formation d'oligomères.

15 Le produit de la réaction est dans chaque cas un résidu S-carboxyméthylcystéinyl ou S-carboxyméthylamidocystéinyl.

Un fragment peut comporter de 8 à 110 acides aminés par exemple, de préférence de 12 à 60 acides aminés et notamment de 12 à 40 acides aminés. Un tel fragment peut comporter aussi du ou des côtés C ou N  
20 terminal de 1 à 5 acides aminés supplémentaires c'est-à-dire différents du segment d'origine. Un fragment doit en outre comporter une cystéine au moins pour pouvoir faire l'objet par exemple d'une carboxyméthylation. Les fragments, s'ils seront de préférence choisis inactifs par eux-mêmes, pourront en effet soumis si désiré aux mêmes traitements d'inactivation que les protéines  
25 entières ou presque entières.

La réaction de carboxyméthylation ci-dessus peut aussi être réalisée avec d'autres agents chimiques comme l'acide performique, l'acide 3-bromopropionique, l'éthylénéimine, le bromure de (2-bromoéthyl) triméthylammonium, le 2-bromoéthane sulfonate, la 1,3-propanesulfone etc....

30 Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre du procédé ci-dessus décrit, ladite protéine ou ledit fragment de départ peut se présenter

sous forme fusionnée à un marqueur (FP) ou non fusionnée (P). La forme FP peut modifier per se la conformation moléculaire et par là modifier son activité.

Les protéines ou fragments de départ du procédé sont des produits connus dont des procédés d'inactivation peuvent avoir été décrits dans la  
5 littérature comme dans WO-A-99/33872. Ces protéines de départ peuvent même être commercialisées (Immunodiagnosics Inc., Cat # 1002-2) ou peuvent être préparées de manière conventionnelle.

On peut en particulier préparer les protéines ou fragments de départ ci-dessus par :

- 10 1) Synthèse par génie génétique ou par synthèse biochimique ;  
2) Purification

Par génie génétique, on peut purifier les protéines produites par chromatographie d'affinité en utilisant par exemple des anticorps dirigés contre la protéine ou un de ses fragments ; on peut aussi synthétiser la protéine  
15 fusionnée à un marqueur (FP) qui servira à l'accrochage à une colonne d'affinité.

Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre du procédé ci-dessus décrit, lorsque la protéine ou fragment est fusionné à un marqueur (FP), il est soumis à :

- 20 - une concentration, par exemple, par ultrafiltration ;  
- un désalage, par exemple, par gel filtration ;  
- un traitement au bromure de cyanogène ou l'entérokinase pour cliver la protéine de fusion et libérer ainsi la protéine ou fragment ;  
- une concentration et diafiltration ;  
25 - une chromatographie par échange cationique ;  
- une concentration par ultrafiltration, suivie par une filtration sur gel d'exclusion.

La réaction au bromure de cyanogène ci-dessus permet de cliver les thioéthers. L'action du bromure de cyanogène sur les molécules  
30 polypeptidiques est sélective en effectuant un clivage au niveau des résidus méthionine existants. Cette réaction aboutit à la formation de 2 fragments

polypeptides par résidu méthionine. Cette réaction peut être avantageusement couplée notamment avec la réaction de carboxyméthylation précédemment décrite mais elle n'est pas nécessaire à l'inactivation.

Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre du  
5 procédé ci-dessus décrit, on prépare la protéine ou le fragment attendu(e) couplé(e) à un composé permettant sa purification, par exemple à un fragment peptidique contenant plusieurs histidines, de préférence en séquence continue de 4, 5, notamment 6 histidines ou plus permettant la fixation à une colonne de Nickel. Dans la mesure où la présence de ce composé n'induit pas de toxicité  
10 et ne modifie pas défavorablement l'immunogénicité de la protéine ou de fragment, il n'est pas nécessaire de le cliver après purification. Toutefois, dans des conditions de réalisation préférée, on clive ce composé pour l'éliminer.

La présente demande a encore pour objet l'utilisation

- d'un produit obtenu à partir d'une protéine naturelle qui sera modifiée par  
15 toute technique connue comme par voie chimique, physique (dont forme galénique) ou par ingénierie génétique, de telle sorte que ses propriétés immunosuppressives sont inactivées d'au moins 70%, de préférence d'au moins 90%, notamment d'au moins 95%, par un traitement chimique, physique et/ou par construction génétique appropriée, voire par une  
20 présentation appropriée, ou
- d'une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif,

pour l'obtention d'une composition pharmaceutique pour la voie muqueuse, notamment pour la voie mucosale comme orale ou pour la voie intranasale  
25 destinée à conférer à un patient une immunité mucosale, fondée sur la sécrétion d'anticorps de classe IgA sécrétoire.

La présente demande a encore notamment pour objet l'utilisation de tels produits pour la fabrication d'un traitement par la voie muqueuse pour lutter contre les protéines immunosuppressives et/ou angiogéniques à action  
30 locale induites notamment par une tumeur cancéreuse ou chez le malade du Sida.

Les protéines modifiées qui sont des protéines initialement notamment immunosuppressives et/ou angiogéniques à action locale induites par les tumeurs cancéreuses chez le malade du Sida et dont les propriétés immunosuppressives sont inactivées par un traitement approprié, les fragments  
5 et les molécules d'ADN correspondant à ces protéines natives inactivées par mutation ou fragments, possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques. Ils sont doués notamment de remarquables propriétés antagonistes des propriétés des protéines immunosuppressives et/ou angiogéniques à action locale induites par une tumeur cancéreuse par  
10 production d'anticorps sécrétoires de classe IgA .

Ces propriétés sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale. Elles justifient l'utilisation des protéines modifiées ci-dessus décrites, fragments et molécules d'ADN à titre de médicament.

En effet, les composés selon l'invention ont perdu leurs propriétés  
15 immunosuppressives ou leurs propriétés angiogéniques et peuvent donc être administrés chez l'homme comme on le verra ci-après dans la partie expérimentale.

C'est pourquoi la présente demande a encore pour objet une composition pharmaceutique pour la voie muqueuse, notamment pour la voie  
20 oromuqueuse comme la voie intranasale ou orale renfermant à titre de principe actif un produit obtenu à partir d'une protéine naturelle qui sera modifiée par toute technique connue comme par voie chimique, physique (dont forme galénique) ou par ingénierie génétique, de telle sorte que ses propriétés immunosuppressives sont inactivées d'au moins 70%, de préférence d'au  
25 moins 90%, notamment d'au moins 95%, par un traitement chimique, physique et/ou par construction génétique appropriée, voire par une présentation appropriée, ou une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif.

Les médicaments selon la présente invention trouvent leur emploi  
30 par exemple dans le traitement tant curatif que des cancers, notamment des cancers induits par des virus comme, par exemple, l'ATL (Acute T cell



leukemia) causé par le HTLV 1, ou le cancer du col utérin causé par le papilloma virus, ou encore le lymphome de Burkitt ou le sarcome de Kaposi causés par des virus de la famille herpès, respectivement l'Epstein-Barr (EBV) et le HHV8 ainsi que dans le traitement du SIDA.

5 Les composés immunogènes selon l'invention peuvent être utilisés comme suit :

On administre à un patient sous une forme adaptée à l'administration mucosale, un composé immunogène ou une molécule d'ADN selon la présente invention, par exemple par voie intranasale, en quantité  
10 suffisante pour être efficace sur le plan thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. La dose administrée peut aller par exemple de 10 à 1000 µg par voie intranasale, une fois par semaine pendant deux mois, puis périodiquement en fonction du taux des anticorps sécrétoires induits, par exemple tous les 2-6 mois.

15 On pourra administrer dans une même préparation deux ou plusieurs molécules immunogènes et/ou molécules d'ADN différentes pour induire des anticorps neutralisant tous les sites fonctionnels délétères au cas où une seule molécule ne porte pas tous les sites actifs de la toxine ou de la cytokine surproduite que l'on veut neutraliser.

20 L'invention a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques destinées aux muqueuses qui renferment au moins un composé immunogène ou molécule d'ADN précité, à titre de principe actif.

A titre de médicaments, les composés immunogènes ou molécules d'ADN de l'invention peuvent être incorporés dans des compositions  
25 pharmaceutiques destinées à la voie muqueuse, notamment oro-muqueuse, en particulier la voie intranasale et la voie orale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain intervalle de temps.

C'est pourquoi la présente demande a également pour objet une  
30 composition pharmaceutique, curative ou préventive pour la voie muqueuse, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, un ou plusieurs

composés immunogènes tels que définis ci-dessus, ou ses fragments ou molécules d'ADN correspondant à la protéine native à combattre. Le composé immunogène, fragment ou molécule d'ADN peut être conditionné seul ou mélangé à un excipient ou mélange d'excipients pharmaceutiquement acceptables tel qu'un adjuvant. Parmi les excipients destinés à la voie intranasale ou orale, on retient particulièrement les capryl caproyl macrogol glycérides comme le Labrasol® de la société GATTEFOSSE ou l'hydroxyde d'alumine (Alhydrogel, Superfos, Danemark).

Il est à noter qu'administré tel quel, selon une formulation orale conventionnelle, le principe actif selon l'invention serait inactif.

Pour l'administration orale selon l'invention, on associera le principe actif à un adjuvant d'immunité mucosale tel qu'un mutant de CT ou de LT.

On retient tout particulièrement les formes galéniques décrites par Boyaka et al : « Strategies for mucosal vaccine development » dans Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(4), 1999, pages.35-45. On peut citer aussi les microgranules gastro résistants, notamment bioadhésifs tels que eux décrits par Rojas et al dans Pharmaceutical Research, Vol. 16, N° 2, 1999, page 255.

La présente demande a plus particulièrement pour objet un vaccin mucosal contenant à titre d'immunogène, un composé immunogène défini ci-dessus et notamment une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale induite par une tumeur cancéreuse ou par des cellules infectées par un virus tel le VIH ou un fragment de cette protéine dont les propriétés immunosuppressives et/ou angiogéniques sont inactivées d'au moins 70 % par un traitement approprié ou une molécule d'ADN correspondant à cette protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre, on retient une composition pharmaceutique vaccinale ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un adjuvant d'immunité mucosale, tel un mutant de CT (cholera toxine) ou de LT (entérotoxine labile d'E. coli).

Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre, on

retient une composition pharmaceutique vaccinale ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle renfermant renferme un adjuvant adsorbant le principe actif, tels l'hydroxyde d'alumine ou les particules d'or.

5 Dans encore d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre, on retient une composition pharmaceutique ci-dessus, caractérisée en ce que la protéine est obtenue par recombinaison génétique et présente une homologie peptidique de 70% au moins avec les protéines Tat du HIV-1, Tax du HTLV1 ou 2 et E7 de l'HPV ou la lectine mannane-dépendante produite par des cellules immunitaires activées ou avec un segment de ces protéines.

10 Dans toujours d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre, on retient une composition pharmaceutique ci-dessus, caractérisée en ce que la protéine a été traitée par un aldéhyde a été carboxyméthylée, carboxamidée ou maléimidée.

La présente invention a encore pour objet un procédé de  
15 préparation d'une composition ci-dessus décrite, caractérisé en ce que l'on mélange, selon des méthodes connues en elles mêmes, le ou les principes actifs avec des excipients acceptables, notamment pharmaceutiquement acceptables et le cas échéant, avec un adjuvant d'immunité mucosale.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre du procédé  
20 ci-dessus, on prépare des microgranules bioadhésifs et gastro résistants pour la voie orale digestive renfermant les principes actifs immunogènes et le cas échéant les adjuvants.

L'administration à un patient de composés immunogènes selon l'invention par voie mucosale correspond à une immunothérapie active. Il peut  
25 être intéressant également de procéder à une immunothérapie passive, c'est à dire de fournir à un patient directement des anticorps de classe IgA dont il a besoin pour neutraliser les effets nocifs des protéines ci-dessus, par exemple des protéines immunosuppressives à action locale induites par des tumeurs.

Ces anticorps de classe IgA par exemple anti-protéines  
30 immunosuppressives et/ou angiogéniques peuvent être obtenus classiquement.

C'est pourquoi la présente demande a également pour objet de tels procédés de préparation d'anticorps de classe IgA anti-protéines notamment immunosuppressives et/ou angiogéniques d'une tumeur cancéreuse et en particulier d'anticorps anti-protéine E7 du papilloma virus ou  
5 anti-protéine Tax de HTLV1, et notamment un procédé de préparation d'un anticorps de classe IgA ci-dessus caractérisé en ce que l'on immunise un mammifère à l'aide d'un composé immunogène tel que défini ci-dessus, puis récupère les anticorps formés.

La présente demande a encore pour objet un anticorps de classe  
10 IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique sécrété par les cellules d'une tumeur cancéreuse ou infectées par un virus tel le VIH-1 et en particulier des anticorps polyclonaux ou monoclonaux obtenus à partir de mammifères immunisés avec un composé immunogène défini ci-dessus et notamment une  
15 protéine immunosuppressive ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse biologiquement inactivée mais immunogène, notamment la protéine E7 du papilloma virus ou la protéine Tax de HTLV1, ou leurs fragments. Ces anticorps administrés passivement, qu'ils soient allogéniques (humains) ou xénogéniques (animaux), pourront être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux complets ou des fragments F(ab')<sub>2</sub> ou Fab de l'anticorps.

20 Par "anticorps anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse", l'on entend des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments F(ab')<sub>2</sub> ou Fab de ces anticorps ou encore des anticorps anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique produits par les cellules d'une tumeur cancéreuse ou infectées par le VIH-1, obtenus par  
25 construction génétique à partir d'une librairie de phages.

Les anticorps xénogéniques proviennent d'animaux hyperimmunisés avec un composé immunogène selon l'invention, notamment avec la protéine E7 du papilloma virus ou la protéine Tax de HTLV1 ou ses dérivés (fragments peptidiques de la protéine E7 du papilloma virus ou de la  
30 protéine Tax de HTLV1 détoxifiés selon l'invention), et sont

- soit polyclonaux provenant d'animaux hyperimmunisés,

- soit monoclonaux, obtenus après hybridation selon la technique que Kohler et Milstein de cellules spléniques ou d'adénocytes avec une lignée myélomateuse, type x63, notamment x63AG3. Dans ce cas on préfère les anticorps équins ou de lapin.

5                   La présente demande a encore pour objet un procédé de préparation d'anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse, caractérisé en ce que l'on immunise par voie muqueuse un mammifère, homme ou animal, avec un composé immunogène tel que défini ci-dessus.

10                  La présente demande a également pour objet un procédé d'obtention d'anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique, par la technologie de recombinaison génétique, caractérisé en ce que l'on utilise à titre d'immunogène un composé immunogène tel que défini ci-dessus.

15                  La présente demande a encore pour objet des fragments F(ab')<sub>2</sub> ou Fab desdits anticorps de classe IgA ; ceux-ci peuvent être obtenus par digestion enzymatique par exemple.

                  La présente invention a tout autant pour objet un procédé d'immunisation passive de sujets cancéreux ou malade du Sida, utilisant des  
20 anticorps spécifiques de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse ou produite par des cellules infectées par un virus et spécialement anti-protéine E7 du papilloma virus ou anti-protéine Tax de HTLV1 neutralisant ou bloquant les effets nocifs de cette protéine et pouvant être préparés comme indiqué ci-dessus, ou des fragments  
25 F(ab')<sub>2</sub> ou F(ab) de ces anticorps.

                  La présente demande a également pour objet un procédé d'immunisation active caractérisé en ce que l'on utilise à titre d'immunogène un composé immunogène tel que défini ci-dessus avantageusement associé à un adjuvant d'immunité minéral, huileux ou de synthèse, ou encore un composé  
30 immunogène tel que défini ci-dessus, avantageusement couplé par exemple à l'aide d'un dialdéhyde ou associé à une protéine augmentant son



immunogénicité ou encore une molécule d'ADN correspondant à la protéine à combattre mais inactivée par mutation.

Ces immunisations peuvent être réalisées tant à titre curatif qu'à titre préventif.

5 A titre d'immunogènes, pour tous les procédés ci-dessus et ci-après, on utilise de préférence un dérivé de la protéine E7 du papilloma virus ou de la protéine Tax de HTLV1.

L'invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique pour la voie mucoale comprenant, à titre de principe actif curatif ou préventif ,  
10 au moins un anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse tel que défini ci-dessus ou obtenu selon les procédés ci-dessus éventuellement associé à un anticorps de classe IgG anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse.

15 En résumé et notamment, la présente invention a pour objet l'usage à titre préventif, ou curatif chez le sujet cancéreux ou atteints de Sida d'anticorps de classe IgA de manière à bloquer l'action notamment immunosuppressive d'une protéine à action immunosuppressive locale ou angiogénique d'une tumeur cancéreuse ou des cellules infectées par un virus  
20 et notamment de la protéine Tat du VIH-1, de la protéine E7 du papilloma virus ou de la protéine Tax de HTLV1. Ces anticorps spécifiques de classe IgA pourront provenir :

1. du sujet lui-même, induits par une immunisation active (vaccination) avec une protéine immunosuppressive locale d'une tumeur cancéreuse sécrétée  
25 par les cellules infectées par un virus privée desdits effets immunosuppressifs mais immunogène ( on a préservé les propriétés susceptibles d'induire la formation des anticorps, lorsque la protéine est présentée et préparée de manière appropriée, couplée ou non à un "carrier", agrégée ou non, en présence ou non d'adjuvant) ou avec une  
30 molécule d'ADN correspondant à la protéine à combattre mais inactivée par mutation ou audit fragment inactif ou

2. d'un organisme étranger, allo- ou xénogénique, administré au sujet par immunisation passive (sérothérapie). Ces anticorps de classe IgA administrés passivement, pourront être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux complets ou des fragments F(ab')<sub>2</sub> ou Fab de l'anticorps.

5 L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques et notamment une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent préventif ou curatif des anticorps de classe IgA anti-protéine à action immunosuppressive ou angiogénique locale d'une tumeur cancéreuse produits à partir d'organismes immunisés contre ladite protéine ou ses  
10 fragments F(ab')<sub>2</sub> ou Fab, selon l'invention.

En outre l'invention propose également un kit comprenant une composition pharmaceutique vaccinale qui en plus du principe actif (protéine initialement immunosuppressive ou angiogénique locale d'une tumeur cancéreuse mais privée desdits effets immunosuppresseurs ou angiogéniques et  
15 immunogène ou ses dérivés ou anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique locale d'une tumeur cancéreuse ou molécule d'ADN) peut comprendre un adjuvant et/ou un autre immunogène à propriétés anticancéreuses.

Enfin l'invention propose une composition pharmaceutique  
20 adaptée à l'administration mucosale.

Pour diminuer la charge immunosuppressive produite par la tumeur et améliorer encore mieux la réponse immunitaire, on pourra associer à cette immunisation anti-suppressive une immunisation par voie générale par exemple obtenue par injection sous-cutanée, voire des moyens plus classiques  
25 visant à diminuer la taille de la tumeur comme la chimiothérapie, la radiothérapie, l'exérèse chirurgicale ou encore l'adjonction de gènes suppresseurs des tumeurs apportés par des techniques de la thérapie génique (ADN véhiculés par des vecteurs viraux, vecteurs lipidiques etc..) ou encore comme l'immunisation active contre des protéines sans action  
30 immunosuppressive ou angiogénique locale comme les MAGE ou des protéines de structure comme celles du papilloma virus.

On pourra aussi associer d'autres immunisations anti-suppressives et/ou angiogéniques par exemple en immunisant contre des cytokines ou des lectines susceptibles de servir de médiateur à l'action suppressive sur les cellules immunitaires ou associer des immunisations contre  
5 des antigènes tumoraux classiques (non immunosuppresseurs ou angiogéniques) susceptibles d'augmenter la réponse immunitaire cellulaire particulièrement tueuse (cellules CTL ou cellules NK) dirigée contre les cellules tumorales ou infectées par des virus. L'avantage de ces associations est qu'elles permettront au système immunitaire de mieux répondre à l'immunisation anti-  
10 immunosuppressive et par conséquent de mieux se reconstituer.

Pour résumer, à l'immunisation mucosale contre un facteur immunosuppresseur ou angiogénique paracrine présenté sous une forme inactive mais toujours immunogène, on pourra associer des méthodes plus classiques comme radiothérapie, chimiothérapie exérèse chirurgicale ou traitement par  
15 gènes suppresseurs ou encore des immunisations contre des cytokines ou des lectines produites par des cellules immunitaires (cellules T ou APC) médiant l'action immunosuppressive et/ou angiogénique ou contre des antigènes tumoraux.

En effet, dans certains cancers, même d'origine virale, des  
20 facteurs solubles d'origine cellulaire, telles les cytokines ou les lectines peuvent également jouer localement un rôle de médiateur de l'immunosuppression et/ou de l'angiogénèse au sein des tumeurs. C'est le cas de l'IFN $\alpha$ , cytokine immunosuppressive, surproduit localement au sein des tissus lymphoïdes infectés par le HIV dans la maladie Sida.

25 L'expérimentation in vitro sur des cellules mononucléées du sang (PBMC) infectées par le HIV-1 a montré que la protéine Tat était impliquée dans la surproduction par les APC de la cytokine IFN $\alpha$  immunosuppressive. De manière intéressante, la protéine E7 du HPV, tout comme la protéine Tat du HIV-1, induit la surproduction d'IFN $\alpha$  immunosuppresseur par les APC.

30 En conséquence, on pourra également combattre l'échappement immunitaire et/ou l'angiogénèse des cancers, en induisant ou en administrant

des anticorps dirigés spécifiquement contre les cytokines dont la surproduction est responsable d'immunopathogénèse, en particulier d'immunosuppression, tel l'IFN $\alpha$  et/ou de l'angiogénèse, tel le TNF $\alpha$  conformément à la demande de brevet internationale WO 92/225.

5                   Ainsi les effets immunosuppresseurs dus à la surproduction d'IFN $\alpha$  dans les cancers de la maladie Sida et du col utérin tout comme ceux dus à la surproduction de TGFB dans les gliomes viro-induits pourront être bloqués par des anticorps dirigés contre ces cytokines naturelles induits par une immunisation active (vaccination) utilisant des cytokinoïdes (cytokines  
10 modifiées biologiquement inactives mais immunogènes) comme vaccin. De tels anticorps pourront également être administrés passivement (immunisation passive).

Les exemples et expérimentations qui suivent illustrent la présente demande.

15

#### Exemple 1. Préparation de Tat carboxamidé

Le Tat carboxamidé est un produit inactif mais immunogène qui a été préparé par carboxyamidation de la protéine Tat recombinante native. Une préparation de la protéine Tat a notamment été décrite dans WO-A-99/33872.

20

Le Tat toxoïde a été préparé de la façon suivante :

La protéine Tat native recombinante (en solution la plus concentrée possible) est dialysée 16 heures contre du tampon Tris, HCL 0,3 M, contenant de la guanidine 6M et du Dithiothréitol 10mM (rapport volume solution de Tat / volume tampon de dialyse : 1 / 20).

25

Après dialyse, la solution de Tat est recueillie et son volume mesuré. La solution est désaérée par percussion sous pression réduite. On ajoute alors une solution d'acide iodoacétamide 0,5 M désaéré par circulation d'un courant d'azote (dans la proportion de 28  $\mu$ l d'acide iodoacétamide 0,5 M par ml de solution Tat).

30

Sous atmosphère d'azote, la réaction s'accomplit pendant 90 minutes, à 37°C, à l'abri de la lumière.

La réaction est alors bloquée par addition de  $\beta$ -mercaptoéthanol concentré (0,65  $\mu$ l par ml de mélange réactionnel).

Le mélange est à nouveau placé pendant 60 minutes, à 37°C, à l'abri de la lumière, sous atmosphère d'azote.

5 Le mélange est ensuite dialysé, sous agitation, contre du tampon Tris, HCL 0,3 M contenant :

- Urée 8 M : 2 H à température ambiante
- Urée 4 M : 2 H à température ambiante
- Urée 2 M : 2 H à température ambiante
- 10 - PBS 1X : 16 heures à 4°C.

La réaction de carboxyamidation permet de modifier les groupements thiols (groupements sulfhydryl) présents au niveau des résidus cystéines de l'enchaînement en acides aminés. Ces groupements réagissent avec l'acide iodoacétamide par une réaction de S-carboxyamidométhylation. Le  
15 produit de la réaction est un résidu S-carboxyméthylamidocystéinyl.

Exemple 2. Préparation Vaccine recombinante (souche Lister) exprimant la gp160 du VIH-1 (Souche (LAV/IIIB) : construit donné par G. Beaud (Institut Jacques Monod, CNRS, Paris, France).

20

Exemple 3. Plasmide d'expression pSV-Tat

Le plasmide d'expression pSV-Tat a été amplifié dans E. Coli et purifié par centrifugation en chlorure de césium (Advanced Biotechnologies Inc.).

25 Les composés immunogènes des exemples 1, 2 et 3 ont été associés à un adjuvant afin de potentialiser la réponse immunitaire.

Les adjuvants

Différents types d'adjuvant ont été testés :

- 30 - la toxine thermolabile mutée (L.T mutée) de Escherichia coli entérotoxigène (ETEC) : la LT (R192G) décrite par Cardenas-Freytag L et al, Effectiveness



of a vaccine composed of heat-killed *Candida albicans* and a novel mucosal adjuvant, LT (R192G), against systemic candidiasis, Infect immun; 1999, 67 :826-33.

- la sous-unité B (CTB) de la toxine cholérique (CT) de la bactérie *Vibrio cholerae* contaminée par la CT totale.
- le Montanide IMS 1113,
- le C92512,
- l'ISA 51. (SEPPIC).

#### 10 Exemple 4

On a préparé une solution intranasale répondant à la formule

composé de l'exemple 2. .... 10 mg

excipient q.s. pour une solution intranasale terminée à ..... 20 ml

(détail de l'excipient : Labrasol<sup>®</sup>, chlorure de sodium, benzoate de sodium, eau

15 pour préparations injectables).

#### Exemple 5

On a préparé une solution intranasale répondant à la formule

Tat carboxyméthylé décrit dans WO-A-99/33872..... 10 mg

20 excipient q.s. pour une solution intranasale terminée à ..... 20 ml

(détail de l'excipient : Labrasol<sup>®</sup>, chlorure de sodium, benzoate de sodium, eau

pour préparations injectables).

#### Exemple 6

25 On a préparé des capsules orales renfermant chacune :

Composé de l'exemple 1 ..... 200 µg

Alhydrogel de Superfos..... 20 µg

Excipient per os..... qsp. 0,5 ml

Etude pharmacologiqueExpérience 1.

Protocole : des souris ont reçu par voie intramusculaire 100 µl d'émulsion (1 :1), en ISA 51 contenant 25 µg de Tat carboxamidé de l'exemple 1 et 5 µg de LT au jour 0. Ensuite, aux jours 7, 14 et 21, ces souris ont reçu par voie intranasale 10 à 15 µl d'une préparation contenant 25 µg de Tat carboxamidé de l'exemple 1 et 3 µg de LT. Le sérum de ces souris a été prélevé au jour 28.

La recherche d'anticorps anti-Tat, de type IgG et IgA dans leur sérum a été réalisée par le test ELISA suivant : des plaques sont sensibilisées avec du de Tat carboxamidé (1 µg / puits). Les sérums, dilués au 1/4 pour détecter les anticorps de type IgA ou dilués au 1/50 pour les anticorps de type IgG, sont testés selon les protocoles standard d'ELISA . Les résultats obtenus sont exprimés en D.O.

15

	Classe	Souris Contrôles	Souris immunisées
Ac. Anti-Tat	IgG	0,175	2,224
Ac. Anti-Tat	IgA	0,461	1,759

Ce protocole d'immunisation a conduit à augmenter le taux des Anticorps spécifiques de classe IgG et IgA, assurant une immunité à la fois systémique et mucosale, confirmée par la présence d'IgA sécrétoires dans les lavages des sécrétions intestinales réalisées selon la technique de Elson C.V. et al. (J. of Immunol Methods, 1984, 67 : 101-108).

20

Expérience 2 :

Protocole : des souris ont reçu par voie intranasale 10 à 15 µl d'émulsion (1 :1), en IMS 1113 ou C92512, contenant 25 µg de Tat carboxamidé et 5 µg de LT au jour 0. Ensuite, aux jours 7 et 14, ces souris ont reçu par voie intranasale 10 à 15 µl d'émulsion (1 :1), respectivement en IMS 1113 ou en C92512, contenant 25 µg de Tat toxoïde et 3 µg de LT. Le sérum

25

de ces souris a été prélevé au jour 21. La recherche d'anticorps anti-Tat, de type IgG et IgA dans leur sérum a été réalisée par le test ELISA décrit dans le protocole de l'expérience 1.

	Classe	Souris Contrôles	Souris immunisées (C92512)	Souris immunisées (IMS 1113)
Ac. Anti-Tat	IgG	0,2	2,220	1,543
Ac. Anti-Tat	IgA	0,7	0,7	1,092

5

L'utilisation d'adjuvant IMS 1113 (Seppic, France) a permis d'induire une immunité mucosale, caractérisé par l'amplification du taux d'anticorps anti-Tat de classe IgA. Par contre, l'adjonction d'adjuvant C92512 (Seppic, France) ne l'a pas permis.

10

Expérience 3 :

Protocole : des souris ont reçu par voie intranasale 10 à 15 µl d'une préparation contenant 10 µg du plasmide de l'exemple 3, 5 µg/ml de CTB et 5 µg/ml de CT au jour 0. Ensuite, aux jours 7 et 14, ces souris ont reçu par

15 voie intranasale 10 à 15 µl d'une préparation contenant 25 µg de Tat toxoïde et 5 µg/ml de CTB et 0,5 µg/ml de CT. Le sérum de ces souris a été prélevé au jour 21. La recherche d'anticorps anti-Tat, de type IgG et IgA dans leur sérum a été réalisée par le test ELISA décrit dans le protocole de l'expérience 1.

	Classe	Souris Contrôles	Souris immunisées
Ac. Anti-Tat	IgG	0,3	2,123
Ac. Anti-Tat	IgA	0,2	1,951

20

L'immunisation par voie intranasale au moyen de plasmide anti-Tat caractérisé par une augmentation d'IgA et confirmée par la présence d'IgA sécrétoires dans les sécrétions intestinales.

Expérience 4 :

Protocole : des souris ont reçu par voie orale 200 µl d'une préparation contenant 10<sup>6</sup> PPU/ml de vaccine recombinante exprimant la gp160, 5 µg/ml de CTB et 0,5 µg/ml de CT aux jours 0, 7 et 14. Le sérum de ces souris a été prélevé au jour 21.

La recherche d'anticorps anti-Tat, de type IgG et IgA dans leur sérum a été réalisée par le test ELISA suivant : des plaques sont sensibilisées avec de la gp160 recombinante native (1µg/puits). Les sérums, dilués au 1/4 pour détecter les anticorps de type IgA ou dilués au 1/50 pour les anticorps de type IgG, sont testés selon les protocoles standards d'ELISA. Les résultats obtenus sont exprimés en D.O.

	Classe	Souris Contrôles	Souris immunisées
Ac. Anti-gp160	IgG	0,112	1,283
Ac. Anti-gp160	IgA	0,440	1,02

L'augmentation des anticorps de classe IgG et IgA reflète une immunité à la fois systémique et mucosale anti-gp160.

Expérience 5 :

Protocole : des souris ont reçu par voie intranasale aux jours 0, 7, 14 et 21 10-15 µl de PBS contenant comme immunogène 50 µg de Tat carboxamidé de l'exemple 1 et comme adjuvant LT (3-5 µg) et 2 µl d'hydroxyde d'aluminium (Alhydrogel 85 de Superfos Biovector, Danemark). La recherche d'anticorps anti-Tat de type IgG et IgA dans leurs sérums a été réalisée par ELISA suivant le protocole de l'exemple 1.

	Classe	Souris Contrôles	Souris immunisées
Ac. Anti-Tat	IgG	0,182	2,042
<sup>2</sup> Ac. Anti-Tat	IgA	0,461	1,258

L'agrégation de l'immunogène Tat Toxoïde autour des particules d'hydroxyde d'alumine en présence du LT a facilité la réponse anticorps anti-Tat.



REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires ou encore d'un  
5 fragment inactif de cette protéine, ladite protéine étant une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale dont ces propriétés sont rendues inactives d'au moins 70 %, par un traitement physique et/ou chimique, tel qu'une formolation, une carboxamidation, une carboxyméthylation, une maléimidation ou une oxydation par barbotage d'oxygène, par  
10 recombinaison génétique ou encore par un conditionnement adjuvant, ledit traitement lui conservant la propriété d'être reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine, et lui conservant des propriétés immunogènes suffisantes pour générer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, ou encore l'utilisation d'une molécule d'ADN correspondant à ladite  
15 protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif, pour l'obtention d'un médicament destiné à conférer à un patient une immunité mucosale fondée sur la sécrétion d'anticorps de classe IgA.

2. Utilisation d'une protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires ou encore d'un  
20 fragment inactif de cette protéine, ladite protéine étant une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale dont ces propriétés sont rendues inactives d'au moins 70 %, par un traitement physique et/ou chimique, tel qu'une formolation, une carboxamidation, une carboxyméthylation, une maléimidation ou une oxydation par barbotage d'oxygène, par  
25 recombinaison génétique ou encore par un conditionnement adjuvant, ledit traitement lui conservant la propriété d'être reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine, et lui conservant des propriétés immunogènes suffisantes pour générer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, ou encore l'utilisation d'une molécule d'ADN correspondant à ladite  
30 protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif, pour l'obtention d'une composition pharmaceutique vaccinale pour la voie muqueuse, notamment

pour la voie oromuqueuse comme la voie orale ou la voie intranasale destinée à conférer à un patient une immunité mucosale, fondée sur la sécrétion d'anticorps de classe IgA sécrétoire.

3. Utilisation d'une protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires ou encore d'un fragment inactif de cette protéine, ladite protéine étant une protéine initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale dont ces propriétés sont rendues inactives d'au moins 70 %, par un traitement physique et/ou chimique, tel qu'une formolation, une carboxamidation, une carboxyméthylation, une maléimidation ou une oxydation par barbotage d'oxygène, par recombinaison génétique ou encore par un conditionnement adjuvant, ledit traitement lui conservant la propriété d'être reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine, et lui conservant des propriétés immunogènes suffisantes pour générer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, ou encore l'utilisation d'une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif, pour la fabrication d'un traitement par la voie mucosale pour lutter contre les protéines immunosuppressives et/ou angiogéniques à action locale induites notamment par une tumeur cancéreuse.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1, 2 et 3, caractérisée en ce que le composé immunogène dérive d'une des protéines immunosuppressives et/ou angiogéniques suivantes :

- protéine Tat du virus VIH-1
- protéine Tax d'un virus HTLV-1
- protéine E7 du papilloma virus
- lectine mannane-dépendante produite par des cellules immunitaires activées.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 2 et 3, caractérisée en ce que le composé immunogène a été traité par un aldéhyde, ou carboxamidé, ou carboxyméthylé ou maléimidé.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 2 et 3,

caractérisée en ce que la protéine utilisée est une protéine mutée.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 2 et 3, caractérisée en ce que l'on utilise une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif.

5 8. Une composition pharmaceutique vaccinale pour la voie muqueuse, par exemple pour la voie orale digestive ou pour la voie intranasale, renfermant à titre de principe actif une protéine provenant de cellules cancéreuses, de cellules infectées par un virus ou de cellules immunitaires ou encore un fragment de cette protéine, ladite protéine étant une protéine  
10 initialement immunosuppressive et/ou angiogénique à action locale dont ces propriétés sont rendues inactives d'au moins 70 %, par un traitement physique et/ou chimique, tel qu'une formolation, une carboxamidation, une carboxyméthylation, une maléimidation ou une oxydation par barbotage d'oxygène, par recombinaison génétique ou encore par un conditionnement  
15 adjuvant, ledit traitement lui conservant la propriété d'être reconnue par des anticorps dirigés contre ladite protéine, et lui conservant des propriétés immunogènes suffisantes pour générer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, ou encore une molécule d'ADN correspondant à ladite protéine inactivée par mutation ou audit fragment inactif.

20 9. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend un adjuvant d'immunité mucosale, tel un mutant de CT (cholera toxine) ou de LT (entérotoxine labile d'E. coli).

10. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la  
25 revendication 8 ou 9 caractérisée en ce qu'elle renferme un adjuvant adsorbant le principe actif, tel l'hydroxyde d'alumine ou les particules d'or.

11. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 8 à 10 caractérisée en ce que la protéine dérive d'une des protéines immunosuppressives et/ou angiogéniques suivantes :

- 30 - protéine Tax d'un virus HTLV-1  
- protéine E7 du papilloma virus

- lectine mannane-dépendante produite par des cellules immunitaires et particulièrement les lymphocytes T activés

12. Une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 8 à 11 caractérisée en ce que la protéine est obtenue par recombinaison génétique et présente une homologie peptidique de 70% au moins avec les protéines Tat du HIV-1, Tax du HTLV1 ou 2 et E7 de l'HPV ou la lectine mannane-dépendante produite par des cellules immunitaires activées ou avec un segment de ces protéines.

13. Une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 8 à 12 caractérisée en ce que la protéine a été traitée par un aldéhyde ou a été carboxyméthylée, carboxamidée ou maléimidée.

14. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique, caractérisé en ce que l'on prépare une composition pour la voie muqueuse, par exemple pour la voie orale ou pour la voie intranasale telle que définie à l'une des revendications 8 à 13.

15. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'on prépare des microgranules bioadhésifs et gastro résistants pour la voie orale digestive renfermant au moins un principe actif immunogène et le cas échéant le ou les adjuvants.

16. Un anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique à action locale produite par des cellules cancéreuses.

17. Un fragment F (ab')<sub>2</sub> ou F(ab) d'un anticorps tel que défini à la revendication 16.

18. Une composition pharmaceutique renfermant un anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique à action locale induite par une tumeur cancéreuse.

19. Une composition pharmaceutique renfermant

- un anticorps de classe IgG anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique à action locale induite par une tumeur cancéreuse et

- un anticorps de classe IgA anti-protéine immunosuppressive ou angiogénique à action locale induite par une tumeur cancéreuse.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03526

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/21 C07K16/10 A61K9/00 A61K39/00 A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CANCERLIT, AIDSLINE, LIFESCIENCES, CHEM  
ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GIRARD M ET AL: "New prospects for the development of a vaccine against human immunodeficiency virus type 1" COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 322, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 959-966, XP000946873 * sections 2.5 et 2.6 *	1-19
Y	WO 99 39735 A (RES DEV FOUNDATION) 12 August 1999 (1999-08-12) page 4, line 1 - line 14 page 11, line 3 - line 18 examples 7,8,12	1-19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 March 2001

Date of mailing of the international search report

23/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. ational Application No

PCT/FR 00/03526

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 02712 A (GENENTECH INC ;MRSNY RANDALL J (US); FITZGERALD DAVID J (US); GOVE) 21 January 1999 (1999-01-21) page 3, line 14 - line 18 claims 1,7-9 ---	16
Y	WO 96 27389 A (NEOVACS ;ZAGURY JEAN FRANCOIS (FR); BIZZINI BERNARD (FR); ZAGURY D) 12 September 1996 (1996-09-12) cited in the application the whole document ---	1-19
A	BOYAKA P N ET AL: "Strategies for mucosal vaccine development." AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 60, no. 4 Supplement, April 1999 (1999-04), pages 35-45, XP002149414 cited in the application ---	
A	MONTGOMERY P C ET AL: "Induction of secretory and serum antibody responses following oral administration of antigen with bioadhesive degradable starch microparticles" ORAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 13, no. 3, June 1998 (1998-06), pages 139-149, XP002115802 ---	
P,X	BOYAKA P N ET AL: "HIV Tat protein regulation of mucosal immunity." JOURNAL OF HUMAN VIROLOGY, vol. 3, no. 5, September 2000 (2000-09), page 257 XP000990276 2000 International Meeting of the Institute of Human Virology; Baltimore, Maryland, USA; 10-15 septembre 2000 résumé 139 -----	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In: tional Application No

PCT/FR 00/03526

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9939735 A	12-08-1999	AU 3180199 A EP 1061950 A	23-08-1999 27-12-2000
WO 9902712 A	21-01-1999	AU 8392998 A EP 1000162 A	08-02-1999 17-05-2000
WO 9627389 A	12-09-1996	FR 2731355 A AT 196255 T AU 710626 B AU 5007196 A BR 9607659 A CA 2215483 A CN 1181020 A DE 69610295 D DE 69610295 T EP 0814834 A ES 2150107 T JP 11501310 T PL 322143 A PT 814834 T US 6132721 A	13-09-1996 15-09-2000 23-09-1999 23-09-1996 15-12-1998 12-09-1996 06-05-1998 19-10-2000 22-02-2001 07-01-1998 16-11-2000 02-02-1999 05-01-1998 31-01-2001 17-10-2000

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Mondiale de la Propriété Industrielle

PCT/FR 00/03526

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K39/21 C07K16/10 A61K9/00 A61K39/00 A61K39/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CANCERLIT, AIDSLINE, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GIRARD M ET AL: "New prospects for the development of a vaccine against human immunodeficiency virus type 1" COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 322, no. 11, novembre 1999 (1999-11), pages 959-966, XP000946873 * sections 2.5 et 2.6 *	1-19
Y	WO 99 39735 A (RES DEV FOUNDATION) 12 août 1999 (1999-08-12) page 4, ligne 1 - ligne 14 page 11, ligne 3 - ligne 18 exemples 7,8,12	1-19

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 mars 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/03/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : de Internationale No

PCT/FR 00/03526

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 02712 A (GENENTECH INC ; MRSNY RANDALL J (US); FITZGERALD DAVID J (US); GOVE) 21 janvier 1999 (1999-01-21) page 3, ligne 14 - ligne 18 revendications 1,7-9 ---	16
Y	WO 96 27389 A (NEOVACS ; ZAGURY JEAN FRANCOIS (FR); BIZZINI BERNARD (FR); ZAGURY D) 12 septembre 1996 (1996-09-12) cité dans la demande le document en entier ---	1-19
A	BOYAKA P N ET AL: "Strategies for mucosal vaccine development." AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 60, no. 4 Supplement, avril 1999 (1999-04), pages 35-45, XP002149414 cité dans la demande ---	
A	MONTGOMERY P C ET AL: "Induction of secretory and serum antibody responses following oral administration of antigen with bioadhesive degradable starch microparticles" ORAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 13, no. 3, juin 1998 (1998-06), pages 139-149, XP002115802 ---	
P,X	BOYAKA P N ET AL: "HIV Tat protein regulation of mucosal immunity." JOURNAL OF HUMAN VIROLOGY, vol. 3, no. 5, septembre 2000 (2000-09), page 257 XP000990276 2000 International Meeting of the Institute of Human Virology; Baltimore, Maryland, USA; 10-15 septembre 2000 résumé 139 -----	1-15



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 00/03526

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9939735 A	12-08-1999	AU 3180199 A EP 1061950 A	23-08-1999 27-12-2000
WO 9902712 A	21-01-1999	AU 8392998 A EP 1000162 A	08-02-1999 17-05-2000
WO 9627389 A	12-09-1996	FR 2731355 A AT 196255 T AU 710626 B AU 5007196 A BR 9607659 A CA 2215483 A CN 1181020 A DE 69610295 D DE 69610295 T EP 0814834 A ES 2150107 T JP 11501310 T PL 322143 A PT 814834 T US 6132721 A	13-09-1996 15-09-2000 23-09-1999 23-09-1996 15-12-1998 12-09-1996 06-05-1998 19-10-2000 22-02-2001 07-01-1998 16-11-2000 02-02-1999 05-01-1998 31-01-2001 17-10-2000